

· 论 著 ·

表达红色荧光蛋白 DsRed 报告基因的逆转录病毒载体的构建和在肝干细胞体内示踪中的应用

李文林¹, 苏娟¹, 陶欣荣¹, Joseph T Lau², 胡以平^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433; 2. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[摘要] **目的:** 建立表达红色荧光蛋白 DsRed 的逆转录病毒载体, 并对肝原始细胞进行体外标记和体内示踪研究。 **方法:** 将 pDsRed1 1 载体中的 DsRed 片段克隆到逆转录病毒载体 pLNCG C1 中构建了 pLNCG DsRed 载体。将该载体导入 Phoenix 包装细胞, 进而采用乒乓转染的方法感染包装细胞 PT67, 获得高滴度稳定产毒的 PT67 细胞系。 **结果:** 利用 PT67 细胞系产生的病毒上清可以高效的感染体外培养的肝原始细胞系。将这些 DsRed 标记的肝原始细胞移植到小鼠损伤肝脏中, 4 周后可以在再生肝脏中清晰地观察到具有红色荧光的外源细胞。 **结论:** 由于肝脏组织没有红色自发荧光, 用 DsRed 标记肝原始细胞进行肝内示踪时背景干扰小。

[关键词] 红色荧光蛋白; 基因, 报告; 逆转录病毒载体; 肝干细胞

[中图分类号] Q 782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0240-03

Construction of retroviral vector expressing DsRed and its utilization in tracing transplanted liver progenitor cells *in vivo*

LI Wen-lin¹, SU Juan¹, TAO Xin-rong¹, Joseph T Lau², HU Yi-ping^{1*} (1. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct the DsRed expression retroviral vector for *in vitro* tagging the liver progenitor cells for transplantation. **Methods:** The fragment of DsRed was recovered from pDsRed1 1 and cloned into pLNCG C1 to get pLNCG DsRed. After introducing the pLNCG DsRed into Phoenix package cells, the medium was used to Ping-Pong infect another packaging cell line PT67 to get stable virus-producing cell line. The cell line was used to infect liver progenitor cells. DsRed tagging liver progenitor cells were transplanted into the mouse liver by spleen injection. **Results:** The viral supernatants of PT67 cells efficiently infected cultured liver progenitor cells. After transplanting the cells into mouse injured liver, DsRed positive hepatocytes were observed in liver cryostat sections after 4 weeks. **Conclusion:** For there is no red autoluminescence in liver tissue, DsRed is a better marker than EGFP to trace transplanted liver progenitor cells.

[KEY WORDS] red fluorescence protein; gene reporter; retroviral vector; liver epithelial progenitor cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 240-242]

绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 在 1994 年首次被用作标记分子^[1], 目前 GFP 衍生而来的 EGFP (enhanced green fluorescence protein) 已经广泛的被应用于细胞生物学、发育生物学等生命科学的诸多领域。GFP 除了作为示踪分子用来标记细胞、细胞器以及生物大分子外, 目前还开发了许多具有特定功能的 GFP, 如可用来监测细胞内 pH 值的 pH 敏感 GFP^[2]。本实验室在对肝干细胞的研究中, 也曾利用 EGFP 作为示踪分子将标记后的肝原始细胞进行肝内移植。但是我们发现, 在 480 nm 的激发光下肝组织本身具有黄绿色自发荧光, 尤其是损伤后的肝脏自发荧光之强足以形成干扰。相对 GFP 而言, 检测红色荧光蛋白

DsRed 时较少受到自发荧光的干扰。在本研究中, 我们选用了 DsRed 作为报告基因示踪移植的肝原始细胞。

1 材料和方法

1.1 动物 C57 小鼠由第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室 SPF 级动物房 (医动字第 02-68 号) 提供。

[基金项目] 国家自然科学基金 (30470876, 30270668, 30270603, 30200138); 上海市科委重大项目 (03DJ14020)。

[作者简介] 李文林 (1975-), 男 (汉族), 博士, 讲师。

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

1.2 主要试剂 dNTP、*Taq plus* DNA 聚合酶、T 载体购自 Sangon 公司;限制性内切酶和 T_4 DNA 连接酶购自 MBI Fermentas 公司;超纯质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 V-gene 生物化学技术公司,质粒大抽试剂盒购自 Qiagen 公司;细胞培养用 G418、DMEM 高糖培养基均购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.3 细胞 逆转录病毒包装细胞系 Phoenix 由长海医院血液科王健民教授赠送,肝原始细胞系 LEPCs 由本实验室建立。逆转录病毒包装细胞系 PT67、NIH-3T3 细胞、大肠杆菌 DH5 α 均由本室保存。

1.4 pLNCG DsRed 载体的构建 将 pLNCG C1 载体用 *Hind* III 和 *Not* I 双酶切,得载体的骨架片段。将 pDsRed11 载体用 *Hind* III 和 *Not* I 双酶切,得 DsRed 片段。将载体的骨架片段和 DsRed 片段用 T_4 DNA 连接酶连接得到 pLNCG DsRed 载体。

1.5 乒乓转染法获得高滴度的 pLNCG DsRed 永久产毒 PT67 细胞系 将 Phoenix 细胞接种于 6 孔板,待生长至大约 50% 融合时,用 Fungene 6 转染试剂将 pLNCG DsRed 质粒导入 Phoenix 细胞。转染后 12 h 换新鲜培养基,48 h 后收获培养基,0.45 μ m 滤膜过滤后得到含病毒上清^[3]。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 1:3 稀释病毒上清,添加终浓度 4 μ g/ml 的 Polybrene 后感染 60 mm 平皿中处于对数生长期的逆转录病毒包装细胞系 PT67。感染后 12 h 换新鲜培养基继续培养 12 h,重复上述感染过程 1 次。再培养 24 h 后,向培养基中添加终浓度为 500 μ g/ml 的 G418 筛选 2 周得到稳定产毒细胞系,扩增并冻存。

1.6 PT67 产毒细胞系病毒滴度测定 将筛选后的 PT67 细胞接种于 60 mm 培养皿,待细胞生长到大约 80% 融合时更换新鲜培养基继续培养 24 h,收获培养液并用 0.45 μ m 滤膜过滤后得到含病毒上清。同时将 NIH-3T3 细胞每孔 $10^4/90 \mu$ l 接种于 96 孔板,12 h 后在 1A~12A 每孔添加病毒上清 10 μ l,混匀后吸取 10 μ l 添加到对应的 1B~12B 孔,依次稀释。继续培养 36 h 观察各孔荧光细胞的个数。病毒滴度(U/ml)=相应孔中荧光细胞数/相应孔中病毒上清的体积(μ l) \times 1 000。

1.7 感染 LEPCs 细胞 如上所述收获 PT67 细胞产毒上清,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 1:3 稀释并添加终浓度 4 μ g/ml 的 Polybrene 后感染 60 mm 平皿中处于对数生长期的 LEPCs 细胞。12 h 后更换新鲜培养基,48 h 后向培养基中添加终

浓度为 800 μ g/ml 的 G418 筛选 2 周得到稳定转染的细胞,观察荧光、扩增并冻存。

1.8 DsRed 标记 LEPCs 细胞的肝内移植和跟踪 取 2 个月龄 C57 小鼠 16 只,腹腔注射四氯化碳 2 ml/kg (四氯化碳 1:10 稀释于橄榄油中)诱导急性肝损伤。3 d 后经脾脏移植 DsRed 标记 LEPCs 细胞^[4,5]。小鼠经戊巴比妥麻醉后,在其左侧肋骨下剪开一个小口,挤出脾脏,将 10^6 个(悬浮于 200 μ l 细胞培养液中) DsRed 标记的 LEPCs 细胞用 4 号针注射到脾脏的下端,结扎止血,缝合皮肤。4 周后处死小鼠,取出肝脏,并立即在液氮中速冻。切 10 μ m 的冰冻切片,室温干燥 2 h,不固定直接观察荧光。

2 结果

2.1 pLNCG DsRed 病毒载体的包装和目的细胞的感染 构建的 pLNCG DsRed 载体经酶切鉴定与预期相符(结果未显示),pLNCG DsRed 转染 Phoenix 细胞后 24 h 即可观察到红色荧光(结果未显示),并包装产生病毒颗粒。利用 Phoenix 细胞产生的病毒上清 2 次感染 PT67 细胞,48 h 后超过 90% 的细胞表达 DsRed(图 1A),经 G418 筛选得到稳定产毒细胞(在筛选过程中几乎没有细胞死亡)。进而用 PT67 细胞产生的病毒上清感染 96 孔板中的 NIH-3T3 细胞测定上清中的病毒滴度,所有 A、B、C、D 排孔中都有 DsRed 阳性的细胞,1E~12E 中有 8 孔有 DsRed 阳性的细胞,1F~12F 中仅有 2 孔有 DsRed 阳性的细胞。这表明乒乓转染法获得的 PT67 细胞系产毒滴度可达 10^6 。该 PT67 细胞系产生的病毒上清可以高效的感染 LEPCs 细胞,用 1:3 稀释的病毒上清(含病毒上清 1.5 ml)感染 60 mm 平皿中大约 30% 融合的 LEPCs 细胞,几乎可以使所有的细胞成功标记(图 1B)。

2.2 DsRed 标记 LEPCs 细胞的肝内示踪 将 DsRed 标记的 LEPCs 经脾脏移植到小鼠四氯化碳损伤的肝脏,4 周后可以在宿主再生肝脏中检测到 DsRed 阳性细胞。从再生肝脏的冰冻切片观察,DsRed 阳性细胞较为均匀的散布于肝脏中并分化为成熟肝细胞,在形态上与内源的肝细胞不可区分(图 1C, 1D)。

3 讨论

通过逆转录病毒进行基因转染具有显著的优点。逆转录病毒可以将外源基因稳定的整合到细胞的基因组中,而且这种整合通常是单拷贝的;逆转录

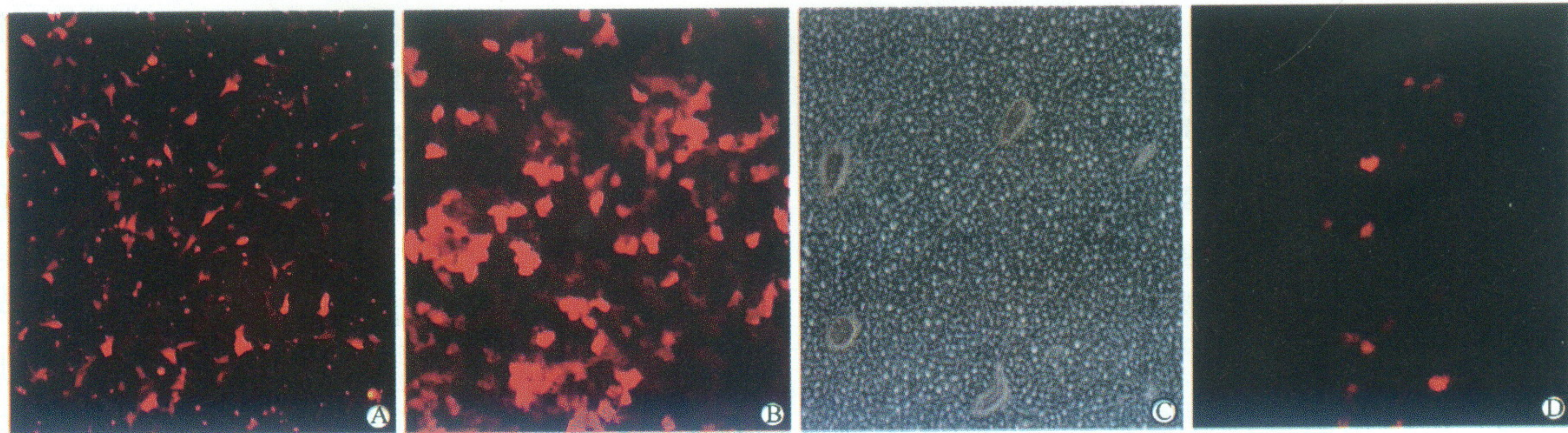


图1 pLNCG DsRed 病毒载体的包装和 LEPCs 的感染及移植

Fig 1 Package of pLNCG DsRed and transplantation of DsRed tagging LEPCs(×200)

After introducing the pLNCG DsRed into Phoenix package cells, the medium was used to Ping-Pong infect another packaging cell line PT67 (A). The viral supernatants of PT67 cells efficiently infected cultured LEPCs (B). After transplanting the cells into mouse injured liver, DsRed positive hepatocytes were observed in liver cryostat sections after 4 weeks (C, D). D represented the corresponding fluorescence photograph exciting at 560 nm for C

病毒的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)包含强启动子,在体外通常可以维持外源基因的高效表达^[6]。目前包装逆转录病毒通常有2种策略:瞬时产毒策略和永久产毒策略。瞬时产毒的一般采用293T细胞或者由其衍生而来的包装细胞系,用于稳定产毒的细胞系则一般来源于NIH-3T3细胞。瞬时产毒策略可以快速获得高滴度的病毒,但是每次需要病毒时都要临时制备。而永久产毒策略则可以获得稳定产毒的细胞系,然而用常规的转染方法获得高滴度的永久产毒细胞系却并不容易。通常需要对转染后的包装细胞进行单克隆纯化,并对这些克隆逐一筛选找到产毒滴度高的克隆。而通过乒乓转染的方式则可以快速的获得高滴度的稳定产毒细胞系,当然要实现乒乓转染必须首先确保2种包装细胞系产生的病毒由不同的受体感染细胞。另外,通过乒乓转染还可以方便的改变病毒的亲嗜性。例如利用单嗜性Phoenix包装细胞产生的病毒只能感染啮齿动物的细胞,但是通过单嗜性Phoenix细胞产生的病毒乒乓感染双嗜性包装细胞(如PA317或PT67)后产生的病毒则可以感染啮齿也可以感染人的细胞。

在本实验室的前期工作中,我们曾使用表达EGFP的逆转录病毒标记LEPCs细胞并进行肝内移植。但是,肝脏组织本身在480 nm激发光下具有黄绿色的荧光,尤其是损伤后的肝脏背景荧光更强,这对外源移植细胞的观察带来了干扰。因此,在本研究中我们构建了表达DsRed的逆转录病毒载体,实验证明通过红色荧光示踪外源细胞可以获得更高的信噪比,受到的干扰少。DsRed是Clontech公司的第1代红色

荧光蛋白,在细胞中通常以四聚体的形式存在,可溶性不及EGFP,毒性也较大。但是在本实验中没有观察到DsRed对细胞的活力有明显的影晌。DsRed标记的外源细胞可以在宿主肝脏中长期嵌合,移植后6个月仍可检测到,但是DsRed阳性的细胞数目显著下降、荧光强度有所减弱。

(致谢:感谢江千里博士在逆转录病毒包装中给予的大力帮助)

[参考文献]

- [1] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263(5148):802-805.
- [2] March JC, Rao G, Bentley WE. Biotechnological applications of green fluorescent protein[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(4):303-315.
- [3] Pear W, Nolan GP, Scott M, *et al.* Production of high titer helper-free retroviruses by transient transfection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(18):8392-8396.
- [4] Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, *et al.* Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV deficient rat and other rodent recipients: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule[J]. *Hepatology*, 1996, 23(3): 482-496.
- [5] Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. Integration of transplanted hepatocytes in host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV deficient rats[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(13): 5860-5864.
- [6] Somia N. Gene transfer by retroviral vectors: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 246:463-490.

[收稿日期] 2004-10-27

[修回日期] 2004-12-22

[本文编辑] 尹 茶